

CENTEON PHARMA GMBH
ANR: 8177007

2000/A002-Ma1227-A1
Dr. Lp/Mi

Thrombin-Zubereitungen und Verfahren zu ihrer Herstellung

Der Gegenstand der Erfindung ist eine im flüssigen Zustand stabile Thrombin-Zubereitung, die sich durch eine hohe Reinheit und Virussicherheit auszeichnet, sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung.

Seitdem es gelungen ist, Thrombin kommerziell herzustellen, haben sich hierfür mehrere Anwendungen ergeben. Als Hauptanwendungen sind derzeit neben diagnostischen Zwecken der Einsatz als lokales Hämostyptikum oder als Komponente eines Gewebeklebers zusammen mit einer Fibrinogen-haltigen Komponente zu nennen. Voraussetzung für den Einsatz von Thrombin für medizinische Zwecke ist, dass es dem Arzt als stabiles Präparat zur Verfügung gestellt werden kann, welches eine hohe Virussicherheit aufweist und möglichst keine unwirksamen Neben- oder Abbauprodukte des Thrombins enthält.

Zahlreiche Methoden zur Stabilisierung von Thrombin sind bereits vorgeschlagen worden. So ist aus der japanischen Patentanmeldung Nr. 56-39782 ein Verfahren bekannt, bei dem organische Mono- oder Polycarbonsäuren und/oder Mono- oder Polyhydroxycarbonsäuren zur Herstellung von stabilen wässrigen Lösungen von Thrombin eingesetzt werden. Aus der japanischen Patentanmeldung Nr. 57-18985 ist Albumin als Stabilisator für Thrombin und aus der japanischen Patentanmeldung Nr. 62-106028 eine Pufferlösung als Stabilisator bekannt. In der europäischen Patentanmeldung

0 302 754 werden ein Zucker und eine Aminosäure, bevorzugt in einer Konzentration von 1 bis 10 Gew.%, als Stabilisatoren für Thrombin-Lösungen vorgeschlagen.

Des weiteren ist aus der deutschen Offenlegungsschrift

31 22 926 eine lagerfähige Thrombin-Zubereitung bekannt, die neben Natriumchlorid mehrwertige Alkohole mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen, schwefelfreie Aminosäuren und Polyethylenglykol zur Herstellung von Thrombinlösungen beschreibt. Schließlich ist auch in der europäischen Patentanmeldung 0 221 700 eine bei einem pH-Wert von 5 bis 8 gepufferte Thrombin-Zubereitung beschrieben, die ggfs. Natriumchlorid und eine Polyhydroxyverbindung enthalten kann.

Gepufferte und stabilisierte Thrombinlösungen sind auch aus einer Veröffentlichung von J. Chabbat et al. bekannt [J. Chabbat, M. Tellier, P. Porte und M. Steinbuch: Properties of a new fibrin glue stable in liquid state. Thromb. Res. 76: 525-533 (1994)].

Darüberhinaus ist auch schon in einer Publikation von D.V. Brezniak, H.I. Hassouna und J.W Fenton II [Blood Coagulation and Fibrinolysis, 6, 847-848 (1994)] der Einfluss von Salzen auf die Stabilität von verdünnten α -Thrombin-Lösungen beschrieben worden. Hier wurde gezeigt, dass in verdünnten Thrombin-Lösungen Natriumchlorid-Konzentrationen ab 0,3 Mol/l eine deutliche Stabilisierung bewirken. Danach soll Thrombin in Natriumchlorid-haltigen Lösungen für etwa 2 Wochen bei 37°C stabil sein und somit eine höhere Stabilität als in Calciumchlorid-haltigen Lösungen aufweisen, was möglicherweise durch eine bessere thermische Stabilität gegenüber einer Denaturierung erklärt werden kann.

In zahlreichen Patentanmeldungen sind auch bereits Verfahren zur Herstellung hochgereinigter Thrombin-Zubereitungen beschrieben worden. So ist aus der

europäischen Patentanmeldung 0 439 156 ein Verfahren für die Herstellung eines gereinigten Thrombins mit einer spezifischen Aktivität größer als 1600 U/mg bekannt, das für die Hämostase eingesetzt werden kann. Dabei wird Thromboplastin zur Aktivierung von Prothrombin verwendet und eine Anionenaustausch- und eine Kationenaustauschchromatographie mit Trägermaterialien basierend auf Agarose eingesetzt. Ein "ultra-reines", klares, farbloses Rinder-Thrombin mit einer spezifischen Aktivität von ca. 8.000 bis 11.000 NIH U/mg wird in der US-Patentschrift 5 397 704 beschrieben. Zur Prothrombin-Aktivierung wird dort Thromboplastin aus Rinderlunge eingesetzt und zur Proteinreinigung werden Anionenaustausch- und Kationenaustauschchromatographie verwendet.

Keines der bisher bekannten Verfahren erlaubt jedoch die Herstellung einer gereinigten, Calcium-Ionen enthaltenden, virussicheren und im flüssigen Zustand bei 0°C und höheren Temperaturen stabilen Thrombin-Zubereitung, deren Thrombinaktivität nach 12 Monaten und darüber hinaus noch bei über 70-80 % des Ausgangswertes liegt. Es stellte sich deshalb die Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung einer derartigen Thrombin-Zubereitung zu entwickeln, wobei aus Gründen der Präparatesicherheit auf die Verwendung von Thromboplastin bei der Prothrombin-Aktivierung verzichtet werden sollte. Außerdem bestand die Aufgabe, hohe Konzentrationen von Polyolen als Stabilisatorzusatz zu vermeiden, weil dadurch eine unerwünschte Erhöhung der Viskosität der Zubereitung eintritt.

Es wurde nun gefunden, dass diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Herstellung einer Thrombin-Zubereitung gelöst wird, bei dem ein aus Plasma oder einer Plasmafraktion gewonnenes Prothrombin nach Aktivierung zu Thrombin ohne Zusatz von Thromboplastin sowie gegebenenfalls weiteren Aufarbeitungsschritten durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt wird und gegebenenfalls anschließend die Viren inaktiviert oder entfernt werden.

Eine weitere Verbesserung dieses Verfahrens ist möglich, wenn vor oder nach der hydrophoben Interaktionschromatographie zusätzlich noch eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt wird. Dabei können die Chromatographien als "positive" (Bindung des Thrombins) oder als "negative" Chromatographie (Bindung der Verunreinigungen) durchgeführt werden.

Es ist bereits bekannt, dass für die Erzielung einer hohen Stabilität im flüssigem Zustand eine ausreichende Reinheit der eingesetzten Thrombin-Lösung notwendig ist. Deshalb wurde nach einem einfachen und verbesserten Verfahren gesucht, um hochreines Thrombin mit hoher Virussicherheit herzustellen. Ausgegangen werden kann dabei von dem in der europäischen Patentanmeldung 0 543 178 beschriebenen Verfahren zur Herstellung eines Thrombinkonzentrats. Aber auch andere Verfahren, bei denen teilgereinigtes Prothrombin in Anwesenheit von Calciumsalzen zu Thrombin aktiviert wird, können erfindungsgemäss als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Thrombin-Zubereitung eingesetzt werden.

Setzt man nun zur Thrombin-Reinigung die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) allein oder in Kombination mit einer Kationenaustauschchromatographie (CEC) ein, dann wird dadurch eine effektive und einfache Reinigung erreicht. Die Reihenfolge dieser beiden chromatographischen Verfahren ist dabei beliebig. Wird die Chromatographie zunächst mit einem hydrophoben Träger durchgeführt, kann das Thrombineluat anschließend direkt an den Kationenaustauscher gebunden und dort mittels eines Salzgradienten eluiert werden. Durch Kombination dieser beiden Trennprinzipien wird bei einer guten Ausbeute von etwa 70% über beide Reinigungsschritte eine Thrombin-Zubereitung hoher Reinheit erhalten. Gleichzeitig wird dabei auch eine gute Abtrennung von Nebenprodukten wie aktivierten oder nicht-aktivierten Gerinnungsfaktoren und von im Gerinnungstest inaktiven Thrombin-Formen (z.B. β -Thrombin, γ -Thrombin oder anderen Thrombin- oder Prothrombinfragmenten) erreicht. Die Kombination der beiden

genannten chromatographischen Verfahren ergibt eine höhere Reinheit als die alleinige Verwendung einer Ionenaustauschchromatographie.

Das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren wird so durchgeführt, dass zunächst Thrombin geringer oder mittlerer Reinheit hergestellt wird. Dies kann so erfolgen, dass die Adsorption von Prothrombin aus Plasma oder einer Plasmafraktion an einem Ionenaustauscher erfolgt. Das dadurch gewonnene Prothrombin kann dann einer Virusinaktivierung, z.B. mittels Pasteurisierung oder einer anderen bekannten Methode unterworfen und dann das Thrombin ohne Zusatz von aus tierischem Gewebe gewonnenen Thromboplastin nach an sich bekannten Verfahren aktiviert werden. Mit der sich dann anschließenden hydrophoben Interaktionschromatographie wird eine Abreicherung von begleitenden Plasmaproteinen, aktivierten Faktoren oder ihren Fragmenten sowie von Thrombin-Spaltprodukten erreicht. Dieser Reinigungseffekt wird durch die nachgeschaltete Kationenaustauschchromatographie weiter verstärkt.

Nach Elution des reinen Thrombins wird dann durch Zugabe geeigneter Puffersubstanzen der pH-Wert der Zubereitung auf den Bereich von 5 bis 8 eingestellt und Stabilisatoren zugesetzt.

Bei der als chromatographische Methode an sich bekannten hydrophoben Interaktionschromatographie wird als Adsorbens ein Gel mit gekoppelten, hydrophoben Seitenketten eingesetzt. Besonders geeignete hydrophobe Seitenketten sind hier Phenylreste oder andere Liganden mit einer ähnlichen Hydrophobizität.

Als Kationenaustauscher wird vorzugsweise ein Gel mit hoher Auflösung für die verschiedenen Thrombin-Varianten eingesetzt. Beispiele für geeignete Kationenaustauschergel sind Fractogel EMD SO_3 (Merck, Darmstadt), Macro Prep 50S (Biorad, München) oder andere Kationenaustauscher, die den heutigen Anforderungen bezüglich Reinigung und Sterilisierbarkeit entsprechen.

Die nach chromatographischer Reinigung gewonnene Thrombin-Lösung kann dann unmittelbar einer Filtration über kleinporige Membranen zugeführt werden,

wodurch eine effektive Abtrennung auch kleinster Viren unter Erzielung einer hohen Thrombinausbeute möglich ist.

Zur Formulierung der Thrombin-Zubereitung als einer im flüssigen und gegebenenfalls auch im eingefrorenen Zustand stabilen und lagerfähigen Komponente für den Einsatz in einem Gewebekleber oder alleine als lokales Hämostyptikum sollte mit Hilfe eines Puffers ein pH-Wert von etwa 5,0 bis 8,0 eingestellt werden. Zur Erzielung des gewünschten Effektes bei der Anwendung bzw. zur Stabilisierung werden dann der Zubereitung ein lösliches Calciumsalz, Natriumchlorid, ein Zucker oder ein Zuckeralkohol und/oder eine Aminosäure oder auch das Salz einer Mono- oder Polycarbonsäure und/oder das Salz einer Mono- oder Polyhydroxycarbonsäure zugesetzt. Damit ergeben sich gute Stabilitäten im flüssigen und/oder gefrorenen Zustand für 12 Monate Lagerzeit und darüber hinaus.

Es hat sich auch gezeigt, dass durch Zusatz von die Thrombin-Aktivität in vitro nicht-kovalent inhibierenden Substanzen die Stabilität vor allem bei Raumtemperatur noch weiter signifikant erhöht werden kann, indem die Autolyse des Thrombins zurückgedrängt wird. Geeignete Substanzen hierfür sind Verbindungen wie Benzamidin oder p-Aminobenzamidin oder andere niedrig- bis mittelaaffine Protease-Inhibitoren. Durch Zusatz dieser niedrig- oder mittelaaffinen Inhibitoren wird die Aktivität von Thrombin gegenüber Substanzen wie Fibrinogen nicht wesentlich beeinträchtigt.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren werden Thrombin-Zubereitungen herstellbar, die in flüssigem und/oder gefrorenen Zustand über Monate oder Jahre gelagert werden können und deren Aktivität in dieser Zeit nicht unter 70-80% abfällt.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, auch in Anwesenheit von Calciumsalzen, die die thermische Stabilität von Thrombin erniedrigen [B.H. Landis, K.A. Koehler und J.W. Fento II: Human Thrombins. J Biol chem 256:

4604-4610 (1981)], Thrombin-Zubereitungen herzustellen, die bis zu 24 Monaten und darüber hinaus bei 4°C eine hohe Stabilität ergeben, wie es der Gerinnungstest zeigt. Auch im gefrorenen Zustand sind viele der in Tabelle 4 gezeigten Thrombin-Zubereitungen stabil und selbst bei Raumtemperatur ist die Stabilität in den meisten Fällen für einen Zeitraum von 3 bis 6 Monaten gegeben. Bei Raumtemperatur lässt sich die Stabilität im Besonderen durch den Zusatz niedrig- oder mittelaaffiner Thrombin-Inhibitoren wie z.B. Benzamidin, p-Aminobenzamidin oder anderer Protease- bzw. Thrombin-Inhibitoren erhöhen, ohne dass dabei die Aktivität gegenüber Fibrinogen im Gerinnungstest signifikant abfällt.

Die nach den beschriebenen Verfahren hergestellten Thrombin-Zubereitungen können u.a. als Komponenten eines im flüssigen oder eingefrorenen Zustand lagerfähigen Fibrinklebers, bestehend aus zwei Komponenten, z.B. einer Thrombin- und einer Fibrinogen-haltigen Komponente, oder aus drei Komponenten, z.B. einer Thrombin-, Fibrinogen- und einer Faktor XIII-haltigen Komponente bestehen, wie u.a. in der deutschen Patentanmeldung 198 53 033.1 beschrieben. Dabei kann die so hergestellte Thrombin-Zubereitung entweder in situ mit den anderen Komponenten vermischt werden oder sie kann im Falle eines 3-Komponenten Fibrinklebers auch vorab mit einer der Komponenten vermischt werden, bevor beide der dritten Komponente zugegeben werden. Möglich ist aber auch die Herstellung von lyophilisierten Thrombin-Zubereitungen unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens für therapeutische Zwecke, wobei nach Rekonstitution im flüssigen Zustand noch eine entsprechend hohe Stabilität beobachtet wird.

Schließlich können die erfindungsgemäß hergestellten Thrombin-Konzentrate auch allein oder in Kombination mit Trägermaterialien als Wirkstoff zur lokalen Blutstillung eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1: Thrombinreinigung

Ausgehend von einem Thrombin-Konzentrat geringer oder mittlerer Reinheit, hergestellt nach bekannten Verfahren, wurden zwei Chromatographieschritte durchgeführt.

Zunächst wurde die Thrombinlösung mit 0,6 Mol/l Natriumsulfat versetzt und an einem hydrophoben Chromatographiegel (hier: Phenyl-Sepharose HP, Hersteller: Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) adsorbiert, das zuvor mit Puffer A (10 mMol/l Na-Phosphat pH 6,5) enthaltend 0,6 Mol/l Natriumsulfat äquilibriert worden war. Nach Waschen mit Puffer A enthaltend 0,6 Mol/l Natriumsulfat wurde durch einen Gradienten mit abfallendem Natriumsulfat-Gehalt in Puffer A das gebundene Thrombin eluiert. Verunreinigungen und Thrombinfragmente wurden zu einem großen Teil im Durchlauf oder in den Waschfraktionen abgetrennt.

Die Thrombin-Fraktion wurde ohne weitere Behandlung direkt auf eine mit Puffer A äquilibrierte Kationentauschersäule (hier: Fractogel7 EMD SO_3 , Hersteller: Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben, mit Äquilibrierungspuffer A gewaschen und durch einen Gradienten von 0 bis 1,0 Mol/l Natriumchlorid in Puffer A eluiert. Im Verlaufe der Trennung werden letzte Nebenprodukte und Thrombin-Fragmente abgetrennt, so dass das erhaltene α -Thrombin-Eluat eine hohe spezifische Reinheit von ca. 3500 IU/mg aufwies [Proteinbestimmung mittels Bestimmung der Absorption bei 280 nm und Umrechnung mit dem Faktor von 1,74 für eine 0,1%ige Lösung nach J.W. Fenton, II, M.J. Fasco, A.B. Stackrow, D.L. Aronson, A.M. Young, and J.S. Finlayson. Human Thrombins. J Biol Chem 252: 3587-3598 (1977)]. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse dieser Thrombin-Reinigung und die erhaltene spezifische Aktivität.

Auf dieser Stufe kann das Thrombin in gekühltem oder tiefgekühltem Zustand bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Tabelle 1:

Probe	Absorption 280 nm	Protein* (mg/ml)	Aktivität (IU/ml)	Spezifische Aktivität (IU/mg)
Thrombin, Ausgangsmat	13,78	7,92	6418	810
HIC-Eluat	1,085	0,624	1372	2199
CEC-Eluat	6,65	3,822	13370	3498

* $A_{280,0,1\%} = 1,74$

Beispiel 2: Thrombinreinigung

Ausgehend von einem Thrombin-Konzentrat mittlerer oder geringer Reinheit wurden zwei Chromatographieschritte durchgeführt. Zunächst wurde die Thrombin-Lösung mit 0,6 Mol/l Natriumsulfat versetzt und an einem hydrophoben Chromatographiegel (hier: Phenyl-Sepharose HP, Hersteller: Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) adsorbiert, das zuvor mit Puffer B (10 mMol/l Na-Phosphat, 0,1% PEG pH 6,5 [hier PEG 6000, aber auch andere Molekulargewichtsbereiche sind einsetzbar]) enthaltend 0,6 Mol/l Natriumsulfat äquilibriert worden war. Nach Waschen mit Puffer B enthaltend 0,6 Mol/l Natriumsulfat wurde durch einen Gradienten mit abfallendem Natriumsulfat-Gehalt in Puffer B das gebundene Thrombin eluiert. Verunreinigungen und Thrombinfragmente wurden zu einem großen Teil im Durchlauf oder in den Waschfraktionen abgetrennt.

Die Thrombin-Fraktion wurde ohne weitere Behandlung direkt auf eine mit Puffer C (10 mMol/l Na-Phosphat, 166 mMol/l L-Arginin pH 6,5) äquilibrierte Kationentauschersäule (hier: Fractogel7 EMD SO_3 , Hersteller: Merck,

Darmstadt, Deutschland) gegeben, mit Äquilibrationpuffer C gewaschen und durch einen Gradienten von 0 bis 1,0 Mol/l Natriumchlorid in Puffer C eluiert. Im Verlaufe der Trennung werden noch vorhandene Nebenprodukte und Thrombin-Fragmente abgetrennt, so dass das erhaltene α -Thrombin-Eluat eine hohe spezifische Reinheit von ca. 3300 IU/mg aufwies (vgl. Tabelle 2).

Auf dieser Stufe kann das erhaltene Thrombin in gekühltem oder tiefgekühltem Zustand bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Tabelle 2:

Probe	Absorption 280 nm	Protein* (mg/ml)	Aktivität (IU/ml)	Spezifische Aktivität (IU/mg)
Thrombin, Ausgangsmat	12,49	7,178	5895	821
HIC-Eluat	2,042	1,174	2696	2296
CEC-Eluat	8,03	4,615	15150	3283

* $A_{280,0,1\%} = 1,74$

Beispiel 3: Thrombinreinigung

Entsprechend Beispiel 1 wurde eine Thrombinreinigung durchgeführt, jedoch mit der Abweichung, dass der bei der Chromatographie eingesetzte Puffer anstelle von Natriumphosphat 20 mMol/l L-Histidin enthält. Diese Modifikation ergibt vergleichbare Reinigungsergebnisse wie in Beispiel 1, kann aber die weitere Aufarbeitung zum Endprodukt vereinfachen, wenn hier z.B. Histidin als Puffersubstanz enthalten sein soll.

Beispiel 4: Thrombinreinigung und Filtration

Ausgehend von einem wie in den Beispielen 1 bis 3 gereinigten Thrombin-Eluat wurde nach hydrophober Interaktionschromatographie und Kationenaustauschchromatographie eine Filtration an einer Membran mit kleiner Porengröße durchgeführt (z.B. Planova™ 15 nm). Mit Hilfe dieser Membran lassen sich selbst kleine Viren wie Parvoviren effektiv abtrennen. Es wurde gefunden, dass bei Verwendung des gereinigten Thrombins als Ausgangsmaterial bei einer guten Filtrationsrate sehr gute Ausbeuten bezüglich Thrombinaktivität und Protein erhalten wurden (siehe Tabelle 3). Dadurch ist dieses Verfahren geeignet zur Herstellung eines Thrombin-Konzentrates mit hohen Abreicherungs Faktoren für Viren.

Tabelle 3: Filtration von 123 ml gereinigtem Thrombin über ein Planova™ 15 nm Modul (0,001 m²)

Probe	Thrombin-Aktivität, gesamt	Protein, gesamt*
vor Filtration	800.240 IU	426,8 mg
nach Filtration	797.960 IU	415,8 mg
Ausbeute	99,7%	97,4%

* $A_{280,0,1\%} = 1,74$

Beispiel 5: Thrombin-Formulierungen

Ausgehend von chromatographisch gereinigtem Thrombin wurden verschiedene Formulierungen hergestellt und bei Temperaturen von -20°C, 4°C, 20-25°C und teilweise auch bei 37°C gelagert. Die Herstellung dieser Thrombinlösungen erfolgte durch Diafiltration der gereinigten Thrombinkonzentrate gegen den Formulierungspuffer oder durch Diafiltration gegen einen Grundpuffer und Zusatz der restlichen Additive, pH-Einstellung und Einstellung der Thrombin-Konzentration. Thrombin-Konzentrationen von ca. 1 bis zu ca. 15.000 IU/ml können auf diese Weise hergestellt werden.

Durch Bestimmung der Thrombinaktivität in einem Gerinnungstest mit Fibrinogen als Substrat wurden die Formulierungen auf ihre Stabilität getestet. Tabelle 4 zeigt eine Auswahl der erfindungsgemäßen Formulierungen und ihre Stabilisatorzusammensetzung und Tabelle 5 zeigt die entsprechenden Stabilitätsdaten bei drei Temperaturen.

Tabelle 4: Zusammensetzung von Thrombinformulierungen

1. 360 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
2. 360 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 2% (w/v) Mannitol, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
3. 150 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 2% (w/v) Mannitol, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
4. 90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 100 mMol/l Na-Succinat, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
5. 90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 100 mMol/l Na-Succinat, 2% (w/v) Mannitol, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
6. 90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 50 mMol/l Na-Laktat, 2% (w/v) Mannitol, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
7. 90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 2% (w/v) Mannitol, 10 mMol/l p-Aminobenzamidin, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0

8. 90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 2% (w/v) Mannitol, 10 mMol/l Benzamidin, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
9. 90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 4% (w/v) HSA, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0
10. 90 mMol/l NaCl, 40 mMol/l CaCl₂, 1% (w/v) Mannitol, 142 mMol/l L-Arginin, 5 mMol/l L-Histidin pH 6,0.

Tabelle 5: Stabilität von Thrombin in verschiedenen Formulierungen bei 4°C, -20°C und 20 bis 25 °C

Thrombinaktivität (% vom Nullwert), Lagertemperatur: 4°C

Lagerzeit (Monate)	Ansatz									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	101,5	95,8	98,9	88,6	100,4	110,6	102	100,0	106,8	108,3
3	98,9	109,8	103,4	104,2	108,8	101,6	95,6	93,4	98,5	102,3
6	100,5	117,5	88,4	101,3		108,1	97,6	97,2	103,0	99,4
9	97,5	112,9	95,6	92,9	122,7	102,2	101,7	102,2	91,5	
12	100,2	93,6	95,3		100,2	99,8	101,2	93,5		
18	89,7	n.d.	92,7		n.d.	n.d.	89,2	95,8		
24	100,5	86,8	100,7		100	96,2	89,2	96,2		

Thrombinaktivität (% vom Nullwert), Lagertemperatur: -20°C

Lagerzeit (Monate)	Ansatz									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	103,6	100,4	88,6	94,3			48,0	111,0	106,5	
3	97,5	92,6	104,2	93,0			93,4	103,0	101,3	
6	99,5	92,7	101,3				70,0	107,3	96,4	
9	100,3	81,3	92,9				94,0	108,0	95,3	
12	94,3	100,5	95,3				80,9	104,0	95,1	
18	94,2	n.d.	92,7				n.d.	99,3	99,8	
24	99,0	90,7	100,7				99,2	104,2	100,2	

Thrombinaktivität (% vom Nullwert), Lagertemperatur: 20 bis 25°C

Lagerzeit (Monate)	Ansatz									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	105,6	95,6	90,9	91,8	81,5	81,5	95,5	101,7	101,9	107,3 99,4
3	92,3	88,2	86,9	88,4	80,0	80,0	75,8	95,4	98,3	84,2 98,9
6	85,6	66,3	66,8	80,4			75,3	92,8	90,8	69,4 84,8
9	72,1	58,3	58,8	75,9			59,1	96,1	93,8	48,8 74,4
12	64,2		51,5	65,3			100,9	92,5	42,9	64,7
18							n.d.	n.d.		
24							90,1	84,1		

CENTEON PHARMA GMBH
ANR: 8177007

2000/A002-Ma1227-A1
Dr. Lp/Mi

Patentansprüche:

1. Thrombin-Zubereitung, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie als Stabilisator einen nicht-kovalent bindenden Inhibitor enthält.

2. Im flüssigen Zustand stabile Thrombin-Zubereitung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie neben einem löslichen Calciumsalz und Natriumchlorid als Stabilisatoren

- eine Puffersubstanz,
- einen Zucker oder Zuckeralkohol und/oder eine Aminosäure und/oder
- ein Salz einer Mono- oder Polycarbonsäure oder
- ein Salz einer Mono- oder Polyhydroxycarbonsäure

enthält.

3. Verfahren zur Herstellung einer Thrombin-Zubereitung , **dadurch gekennzeichnet**, dass ein aus Plasma oder einer Plasmafraktion gewonnenes Prothrombin nach Aktivierung zu Thrombin sowie gegebenenfalls weiteren Aufarbeitungsschritten durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt wird und gegebenenfalls anschliessend noch Viren inaktiviert oder entfernt werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass vor oder nach der hydrophoben Interaktionschromatographie zusätzlich noch eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt wird.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Thrombin-Zubereitung auf einen pH-Wert von 5,0 bis 8,0 eingestellt wird.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Thrombin-Zubereitung neben einem löslichen Calciumsalz und Natriumchlorid als Stabilisatoren

- eine Puffersubstanz,
- ein Zucker oder Zuckeralkohol und/oder eine Aminosäure und/oder
- ein Salz einer Mono- oder Polycarbonsäure oder
- ein Salz einer Mono- oder Polyhydroxycarbonsäure

zugesetzt werden.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Stabilisator eine die Thrombinaktivität inhibierende Substanz zugesetzt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass als eine die Thrombinaktivität inhibierende Substanz Benzamidin oder p-Aminobenzamidin zugesetzt wird.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Adsorbens für die hydrophobe Interaktionschromatographie ein Gel mit gekoppelten hydrophoben Seitenketten eingesetzt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die hydrophoben Seitenketten des als Adsorbens eingesetzten Gels Phenylreste oder Liganden ähnlicher Hydrophobizität sind.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 3 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Thrombin-Zubereitung zur Entfernung von Viren durch eine Membran mit geeigneter Porengröße filtriert wird.
12. Thrombin-Zubereitung, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie nach dem Verfahren der Ansprüche 3 bis 11 erhältlich ist.
13. Verwendung der Thrombin-Zubereitung von Anspruch 1, 2 oder 12 als Hämostypticum, Bestandteil eines Hämostypticums oder als Bestandteil eines Gewebeklebers auf der Basis von Fibrinogen.

CENTEON PHARMA GMBH
ANR: 8177007

2000/A002-Ma1227-A1
Dr. Lp/Mi

Zusammenfassung:

Thrombin-Zubereitungen und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die Herstellung einer Thrombin-Zubereitung wird beschrieben, die aus Prothrombin gewonnen wird, das nach Aktivierung zu Thrombin ohne Zugabe von Thromboplastin durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt wird, wobei anschliessend noch Viren inaktiviert oder entfernt werden können. Vor oder nach der hydrophoben Interaktionschromatographie kann zusätzlich noch eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt werden. Es wird ausserdem eine Thrombin-Zubereitung beschrieben, die als Stabilisator einen nicht-kovalent bindenden Inhibitor enthält, der zur Stabilisierung im flüssigen Zustand weitere Stabilisatoren zugesetzt werden können.